

CULTIVO, MORFOLOGIA, ULTRAESTRUCTURA Y TAXONOMIA DE UN FITOFLAGELADO ASOCIADO A MAREAS ROJAS EN CHILE: *HETEROSIGMA AKASHIWO* (HADA) HADA

*CULTURE, MORPHOLOGY, ULTRASTRUCTURE AND TAXONOMY OF A PHYTOFLAGELLATE ASSOCIATED TO A LOCAL RED TIDE IN CHILE: HETEROSIGMA AKASHIWO (HADA) HADA*

O.O. Parra\*, P. R. Rivera\*, G. L. Floyd \*\* y L.W. Wilcox\*\*

RESUMEN

Organismos de una población de un fitoflagelado marino asociado con mareas rojas, que causaron fuertes mortandades masivas de salmones en cultivos en sectores ubicados entre los paralelos 41° 50' S y 43° 00' S, afectando a centros de cultivos en las provincias de Palena y Chiloé (sur de Chile), fueron aislados, cultivados y observados con microscopía fotónica y electrónica de barrido y transmisión.

La morfología y ultraestructura celular indica que estos microorganismos corresponden a la especie *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada, una Raphidophyceae marina, hasta ahora desconocida para Chile y Latinoamérica.

Por la importancia económica del fenómeno se analiza la taxonomía de este fitoflagelado y se entrega información bibliográfica sobre su fisiología y ecología.

ABSTRACT

Specimens of a marine phytoflagellate population associated to red tides, producing mass mortalities of cultivated salmon in farms located between 41° 50' S Lat. and 43° 00' S Lat. and throughout the provinces of Chiloé and Palena (southern Chile), were isolated, cultured and studied with photonic and transmission and scanning electron microscopy.

Both cell morphology and cell ultrastructure show that the microorganism corresponds to *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada, a marine Raphidophyceae, not previously recorded for Chile and Latin America.

Considering the economic importance of the mass mortality phenomenon the taxonomy of this species is discussed, and bibliographic information on its physiology, and ecology is also given.

KEYWORDS: Raphidophyceae, Chloromonadophyceae, culture, morphology, ultrastructure, taxonomy, red tide, Chile.

INTRODUCCION

A fines de agosto y hasta los primeros días de septiembre de 1988 se manifestó un florecimiento explosivo de microalgas fitoplanctónicas en el

área del seno de Reloncaví, zona de Calbuco, Chiloé continental e insular. Este fenómeno afectó a varios centros salmicultores con un impacto económico bastante importante.

La información respecto a la composición específica de este "bloom" no fue en el momento bien determinada. Información a nuestra disposición, posteriormente comprobada por nosotros, indicaba en el inicio una dominancia de las diatomeas *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira aestivalis*, *Grammatophora marina*, *Nitzschia longis-*

\* Departamento de Botánica, Casilla 2407, Ap. 10, Universidad de Concepción, Chile.

\*\* Department of Botany, The Ohio State University, Columbus, OH 43210. U.S.A.

*sima*, *Cerataulina pelagica* y la presencia de un fitoflagelado clasificado entre las Prymnesiophyceae por algunos y entre los Dinoflagelados por otros.

Cultivos unialgales de la especie permitieron su estudio tanto con microscopía fotónica como electrónica de barrido y transmisión. La especie fue determinada como *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada, taxón poco conocido, no señalado aún para las aguas sudamericanas, pero frecuente en las costas de Japón, Europa y Norteamérica.

El objetivo de la presente contribución se orienta a entregar información sobre aspectos referidos al aislamiento, cultivo, ultraestructura y taxonomía del organismo en cuestión.

## MATERIALES Y METODOS

El material base de este estudio correspondió a muestras recolectadas durante la fase explosiva del bloom (4 y 5 septiembre de 1988, 41° 50' S, 73° 50' W). A partir de él se realizaron cultivos de enriquecimiento en medio ES (en agua de mar enriquecida según Starr & Zeikus, 1987) y posteriormente, por el método de la dilución, se llevaron a la condición de cultivos unialgales. Estos últimos se mantienen en la colección de cultivo del Depto. de Botánica de la U. de Concepción a temperatura de 20 °C ± 2 y a un fotoperíodo de 12:12.

Las observaciones al microscopio fotónico se efectuaron con un fotomicroscopio III Zeiss. Otros individuos fueron lavados con agua destilada, secados mediante el método de punto crítico y metalizados con oro. El microscopio electrónico de barrido utilizado es un Etec Autoscan U-1, perteneciente al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Concepción. Para su observación en el microscopio electrónico de transmisión se utilizó un Philips EM 200, Universidad de Concepción y un Zeiss EM-10 CA TEM KV, Department of Botany, Ohio State University, U.S.A. Las células, previamente fijadas con glutaraldehído y tetróxido de osmio, fueron deshidratadas en acetona, embebidas en resina Spurr y cortadas en un ultramicrotomo utilizando un cuchillo de diamante.

## RESULTADOS

### OBSERVACIONES AL MICROSCOPIO FOTÓNICO

Las células al estado monodal son desnudas, esféricas a ovales, suavemente aplastadas dorsoventralmente, y provistas con dos flagelos ubicados en un surco. El tamaño celular de la población estudiada varió entre los 12-20 µm de largo por 8-9 µm de ancho.

Cada individuo lleva 15-20 cloroplastos de color amarillo-café a café-dorado, de forma discoidal, localizados en la periferia celular. El núcleo tiene una posición más o menos central, es de gran tamaño y ocupa buena parte del espacio celular; su forma es circular o a veces piriforme. En el material de cultivo se observó el desarrollo de cistos redondos y división celular longitudinal, que parece ser la única forma de reproducción. Las Figs. 1 y 2 representan organismos tal como se observan en el microscopio fotónico.

### OBSERVACIONES AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO (MEB Y MET)

Las células aparecen rodeadas solamente por la membrana celular o plasmalema, no existiendo pared celular, teca o periplasto. Los flagelos emergen de un surco que alcanza hasta 1/3 - 1/2 de la célula; uno de ellos presenta mastigonemas (pleuronemático), el otro parece ser liso.

El citoplasma se diferencia en un ectoplasma y un endoplasma; el primero integrado por la capa de cloroplastos, mitocondrias y mucocistos, y el segundo ocupado por el enorme núcleo. Los cloroplastos llevan pirenoides orientados centripetamente; los tilacoides aparecen ordenados en lamelas de a tres y/o formando una lamela periférica. En el ectoplasma se encuentra gran cantidad de mitocondrias claramente localizadas entre la capa de cloroplastos y el núcleo. También se presentan vesículas que contienen pelos flagelares. No se observaron estigmas. El núcleo generalmente presenta intrusiones del citoplasma que incluyen mitocondrias. Las Figs. 3 y 4 son una representación esquemática de un individuo mostrando la ubicación de los principales organelos celulares según se observa en el microscopio electrónico de transmisión, y la Fig. 5 una vista de la parte anterior mostrando la emergencia de los flagelos.

TABLA 1. Cuadro comparativo de las principales características ultraestructurales de las Rhaphidophyceae marinas.

	Flagelos heterocómos	Rhizoplasto	Rhizostilo	Estigma	Ectoplasma Endoplasma	Mitosis	Mucoositos	Golgi numeroso en anillo sobre el núcleo	N° de Cloroplastos	Membrana Cloroplasto	Lámina Periférica	Posición Tilacoides	Tilacoides por láminas	Conexión MEC y MIN	Tilacoides Intraparenquiales
<i>Charanella</i> (1) ?	SI	SI	SI	NO	SI	Cerrada	SI	SI	10-20 ch. 1 30-50 ch. 5	4	NO SI(X)	Perpendicular		?	NO
<i>Fibrocapsa</i> (2)	SI	SI	NO	NO	SI	Cerrada	SI	SI	26-75	4	NO SI(X)	Paralelo	2-3	NO	SI
<i>Oblivulodiscus</i> (3)	SI	SI	NO	NO	NO?	Abierta	SI	SI	5-12 6-13	4	SI	Paralelo	3	?	SI
<i>Heterosigma</i> (4)	SI	SI	SI	NO	SI	Cerrada	SI	SI	15-20 10-15	4	SI	Paralelo	3	SI	SI

(1) Mignot, 1967, 1976; (X) Hara and Chihara 1982

(2) Hara and Chihara 1985

(3) Leifvick, 1969; Gibbs, *et al.* 1980

(4) Vesik and Moestrup 1987; presente trabajo.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

De acuerdo a la morfología y ultraestructura anteriormente descrita el material estudiado, actualmente mantenido en cultivos unialgales, corresponde a *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada, de la clase Raphidophyceae (Chloromonadophyceae). En la Tabla I se presenta un cuadro comparativo de las principales características de la estructura celular de las Raphidophyceae marinas, el que al mismo tiempo puede ser utilizado como clave de separación.

Esta clase reúne a un pequeño grupo de flagelados que han sido clasificados indistintamente y, por lo tanto, tiene una posición sistemática incierta. En la Tabla II se reúnen sus principales características.

El nombre Chloromonadophyceae no es aceptado por el Código de Nomenclatura Botánica, ya que está basado en el género *Chloromonas*, el cual no es una Raphidophyceae sino una alga Chlorophyceae.

La incierta posición sistemática de estas algas se refleja en las distintas denominaciones que el grupo ha recibido: Chloromonadales (Smith 1950), Chloromonadineae (Fritsch 1935), Chloromonadophyceae (Klein & Cronquist, 1967; Fott, 1968, 1970), Chloromonadophyta (Graffius, 1966; Loeblich & Fine, 1977) y Raphidophyceae (Christensen, 1964).

El reconocimiento del grupo como independiente de las otras clases data desde 1892 cuando Klebs incluyó los géneros de agua dulce *Gonyostomum* Diesing, *Merotrichia* Mereschkowski y *Vacuolaria* Cienkowski dentro de las *Chloromonadina*. Subsecuentemente, fue reconocido que el organismo marino *Chattonella subsalsa* Biecheler pertenecía a esta clase (Heywood 1978, 1980).

No obstante sus complicaciones sistemáticas, las formas marinas de este grupo han recibido en los últimos años una preocupación creciente, particularmente, por desarrollar florecimientos o bloom algales (Hatano *et al.* 1983; Iwasaki & Sasada, 1969; Kohata & Watanabe 1984, 1986, 1987; Mori *et al.* 1982; Nakamura 1987, Nakamura *et al.* 1987a, 1987b; Nakamura & Watanabe 1983, 1984 a, b y c; Nakamura *et al.* 1987a, 1987b; Nakamura & Watanabe 1983, 1984 a, b y c; Nakamura *et al.* 1982; Okaichi *et al.* 1982; Noro *et al.* 1980; Ono & Takano 1980; Sugahara *et al.* 1982; Watanabe 1982; Watanabe & Harashima 1982; Watanabe *et al.* 1982 a, b, c,

d, e, 1983; 1984 a, b, c, 1987 a, b; Yoshida & Kawaguchi 1983 y Yamochi 1983) como también por su discutida posición filogenética (Gibbs *et al.* 1980; Heywood, 1980; Vesik & Moestrup 1987).

Por otra parte existe una gran confusión respecto a la taxonomía del grupo (Loeblich & Fine, 1977; Hara & Chihara 1985; Hara *et al.* 1985; Vesik & Moestrup 1987). Según Vesik y Moestrup la mayoría de las especies marinas pueden ser asignadas tanto al género *Chattonella* (especie tipo *Chattonella subsalsa* Biecheler 1936) como al género *Heterosigma* (especie tipo *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada 1968). El organismo conocido usualmente como *Olisthodiscus luteus* se considera actualmente que corresponde a *Heterosigma akashiwo*, y que es diferente del real *Olisthodiscus luteus* descrito por Carter en 1937 (Hara *et al.*, 1985; Vesik & Moestrup, 1987). Por otra parte, Loeblich & Fine (1977) son de opinión que los géneros *Fibrocapsa*, *Heterosigma* y *Olisthodiscus* son congénéricos con *Chattonella*, pero indican que las evidencias no son conclusivas por el momento.

Con el objeto de mostrar una visión general de la taxonomía del grupo de las Raphidophyceae marinas se reproduce el cuadro presentado por Vesik & Moestrup, 1987, Tabla III.

Loeblich & Fine (1977) consideran que existen suficientes similitudes morfológicas entre *Olisthodiscus*, *Heterosigma*, *Fibrocapsa* y *Chattonella* para incorporar a los tres primeros géneros dentro de *Chattonella*. Pero Hara & Chihara (1982) no concuerdan en lo referente a la inclusión de *Fibrocapsa*, porque la descripción de *F. japonica* Toriumi & Takano (1975) no coincide con la descripción de Biecheler (1936) para *Chattonella*. Estos últimos autores refuerzan sus argumentos con las diferencias observadas en la ultraestructura.

En relación a su ultraestructura este grupo presenta ciertas similitudes que significaría afinidades filogenéticas con la clase Chrysophyceae: (1) flagelos heterokontos, (2) tilacoides agrupados de a tres, (3) lamela periférica en los cloroplastos. Pero también presenta significativas diferencias como son: (1) la presencia de tricocistos (como los que se presentan en las Dinophyceae) y (2) la carencia de conexiones directas entre el retículo endoplásmico del cloroplasto y la membrana nuclear. Una estructura única del grupo es la presencia de un rhizostilo, el cual conecta los cuerpos basales flagelares al núcleo. Otro carácter prominente

TABLA II. Resumen de las principales características de la clase Raphidophyceae.

Pigmentos principales	:	clorofila <i>a</i> clorofila <i>c</i> diadinoxantina heteroxantina fucoxantina (?)
Producto de reserva	:	aceites
Características del cloroplasto	:	4 membranas 3 tilacoides por lamelas lamela periférica no almacena almidón.
Pared celular	:	ausente
Flagelos	:	2, heterodinámicos anterior, largo con mastigonemas posterior, corto, liso.
Nivel de organización	:	unicelular, flagelar palmeloide
Reproducción	:	por división longitudinal sexual ausente.

es la segregación del citoplasma en un endoplasma central conteniendo un voluminoso núcleo y mitocondrias y un ectoplasma periférico que contiene los cloroplastos, vacuolas, tricocistos y mucocistos.

En general existe poca información sobre la ecología de este grupo y sobre aspectos de su fisiología ambiental. Los mayores aportes han sido efectuados por investigadores japoneses cuyas costas se han visto afectadas repetidas veces por blooms de estos organismos (e.g. Nakamura & Watanabe 1984, Watanabe *et al.* 1984, 1987, y Yamochi 1983).

*Heterosigma akashiwo* es conocida para Japón, Europa y Norteamérica (Loeblich & Fine, 1977). No existe información sobre su presencia en las costas de Sudamérica, y éste sería el primer hallazgo para Chile.

En los últimos años investigadores japoneses han estudiado intensivamente la fisiología y ecología de *Heterosigma akashiwo*, tanto en condiciones naturales como de laboratorio y lo mismo han efectuado con los otros géneros y especies de Raphidophyceae marinas (Watanabe *et al.* 1982 a, e; 1983, 1984, 1987 a, b; Kohata & Watanabe 1984, 1986, 1987 a, b). De esto se deduce la preocupación por obtener el máximo de información científica básica para poder controlar el fenómeno. Aun cuando parte importante de esta información no es extrapolable a nuestra situación, debe a lo menos considerarse que la complejidad del fenómeno, la particularidad de

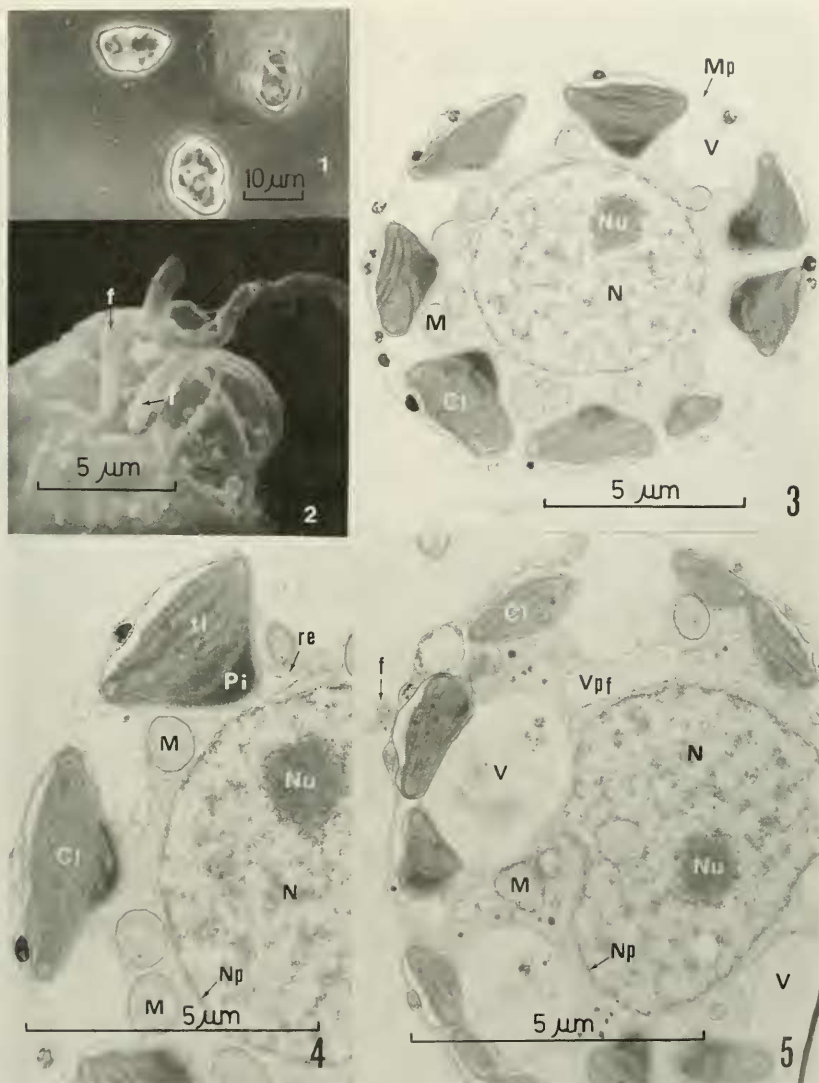
estos organismos y el desconocimiento de las características oceanográficas que regulan los sistemas de los canales del Sur de Chile, hacen evidente la necesidad de generar el máximo de información del fenómeno. Esta es la única forma de evitar daños mayores.

Por el significado que la repetición del fenómeno puede tener para el manejo de la salmonicultura consideramos importante desarrollar un programa de monitoreo, que en lo que a la parte ficológica respecta, sería mantener una frecuencia de muestreo fitoplanctónico en las áreas involucradas. Del material colectado se podría aislar nuevas poblaciones, mantenerlas en cultivo y hacer los estudios que comúnmente se hacen sobre algas productoras de florecimientos o bloom algales.

Por último es importante destacar que fenómenos similares se han detectado en ambientes dulceacuícolas, particularmente en el Lago Llanquihue (Parra y Campos com. pers.). En este lago se detectó un desarrollo expansivo de *Ceratium hirundinella*, una dinoficea desconocida prácticamente para el hemisferio Sur y muy abundante en el hemisferio Norte, especialmente en lagos mesotróficos y eutróficos de Europa (Thomason 1963). La presencia de esta especie dulceacuícola y la de *Heterosigma akashiwo* en Chile podría asociarse a la actividad de salmonicultura, que en las 2 áreas mencionadas es muy intensa. Es posible postular que células o cistos de estas especies pudieron llegar a aguas chilenas junto a las ovas de los salmones.

TABLA III. Lista de los cuatro géneros de Raphidophyceae marinas y los nombres usados en la literatura, según Vesk y Moestrup, 1987.

<p><i>Fibrocapsa</i> Toriumi &amp; Takano 1975 <i>Fibrocapsa japonica</i> Toriumi &amp; Takano 1975 (Hara &amp; Chihara 1985) = <i>Chattonella japonica</i> (Toriumi &amp; Takano) Loeblich &amp; Fine 1977 = <i>Exuviaella</i> sp. (Iwasaki 1971) = <i>Exuviaella</i> sp. FCRG51 (aislada por Jordan. Pt. Loma. California 1970)</p>
<p><i>Chattonella</i> Biecheler 1936 <i>Hornellia</i> Subrahmanyam 1954 * <i>Chattonella subsalsa</i> Biecheler 1936. <i>Chattonella antiqua</i> (Hada) Ono 1980 — <i>Hemientreptia antiqua</i> Hada 1969 * <i>Chattonella marina</i> (Subrahmanyam) Hara &amp; Chihara 1982 — <i>Hornellia marina</i> Subrahmanyam 1954  (* = puede ser la misma especie)</p>
<p><i>Heterosigma</i> Hada 1968 ex Hara &amp; Chihara 1985 <i>Heterosigma akashiwo</i> (Hada) Hada 1968 <i>Entomosigma akashiwo</i> Hada 1967 <i>Heterosigma inlandica</i> Hada 1968 <i>Chattonella luteus</i> (Carter) Loeblich &amp; Fine 1977 = <i>Chattonella inlandica</i> (Hada) Loeblich &amp; Fine 1977 = "<i>Olisthodiscus luteus</i>" Leadbeater 1969 = <i>Chattonella akashiwo</i> (Hada) Loeblich 1979</p>
<p><i>Olisthodiscus</i> Carter 1937 <i>Olisthodiscus luteus</i> Carter 1937 (Hara, Inouye &amp; Chihara 1985)</p>



FIGURAS 1-5: Fig. 1. Células de *Heterosigma akashiwo* al microscopio óptico. Fig. 2. Vista anterior de la célula al microscopio electrónico de barrido, mostrando la zona de inserción de los flagelos (f). Fig. 3. Célula de *H. akashiwo* mostrando su estructura general al microscopio electrónico de transmisión. Fig. 4. Sección mostrando detalle de los cloroplastos (Cl) con sus tilacoides (tl) y pirenoide (pi), mitocondrias (M), núcleo (N), nucleólo (Nu), membrana nuclear (Mn) y la flecha indicando un pliegue del retículo endoplásmico (re). Fig. 5. Sección de una célula mostrando un núcleo central (N), con su nucleólo (Nu), la membrana nuclear o nucleoplasma (Np), mitocondria (M), vacuola (V), numerosos cloroplastos discoidales (Cl) con pirenoide, flagelo (f) y una vesícula con pelos flagelares (Vpf).

LITERATURA CITADA

- BIECHELER, B. 1936. Sur une chloromonadine nouvelle d'eau saumâtre *Chattonella subsalsa* n. gen., n. sp. Arch. Zool. Exp. Génét. 78:79-83.
- CARTER, N. 1937. New or interesting algae from brackish water. Arch. Protistenk. 90:1-68 pls. 1-8.
- CHRISTENSEN, T. 1964. The Gross Classification of Algae. In Jackson, D.F. [Ed.] Algae and man. Plenum Press, New York. 59-64.
- FOTT, B. 1968. VIII. Klasse: Chloromonadophyceae. In Huber-Pestalozzi, G.G. [Ed.] Das Phytoplankton des Süßwassers. 2nd. ed. Vol. 3. Stuttgart, 79-93.
- FOTT, B. 1970. Taxonomische Übertragungen und Namensänderungen unter den Algae III. Chloromonadophyceae. Preslia 42:16-20.
- FRITSCH, F.E. 1935. The Structure and Reproduction of the Algae. Vol. 1. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 721-23.
- GIBBS, S.P. CHU, L.L. & MAGNUSSEN, C. 1980. Evidence that *Olisthodiscus luteus* is a member of the Chrysophyceae. Phycologia 19:173-7.
- GRAFFIUS, J.H. 1966. Additions to our knowledge of Michigan Pyrrophyta and Chloromonadophyceae. Trans. Amer. Microscop. Soc. 85: 260-270.
- HADA, Y. 1967. Protozoan plankton of the Inland Sea, Setonaikai I. The *Mastigophora*. Bull. Susugamine Women's College, Nat. Sci. 13:1-26.
- HADA, Y. 1968. Protozoan plankton of the Inland Sea, Setonaikai II. The *Mastigophora* and *Sarcodina*. Bull. Susugamine Women's College, Nat. Sci. 14:1-28.
- HARA, Y. & CHIHARA, M. 1982. Ultrastructure and taxonomy of *Chattonella* (Class Raphidophyceae) Jap. J. Phycol., 30:47-57 (en japonais).
- HARA, Y. & CHIHARA, M. 1985. Ultrastructure and taxonomy of *Fibrocapsa japonica* (Class Raphidophyceae). Arch. Protistenk. 130:133-141.
- HARA, Y., INOUE, I. & CHIHARA, M. 1985. Morphology and ultrastructure of *Olisthodiscus luteus* (Raphidophyceae) with special reference to the taxonomy. Bot. Mag. (Tokyo), 98:251-262.
- HATANO, S., HARA, Y. & TAKAHASHI, M. 1983. Preliminary study on the effects of photoperiod and nutrients on the vertical migratory behavior of a red tide flagellate, *Heterosigma akashiwo*. Jap. J. Phycol., 31:263-269 (en japonais).
- HEYWOOD, P. 1978. Systematic position of the Chloromonadophyceae. Brit. Phycol. J. 13: 201A.
- HEYWOOD, P. 1980. Chloromonads. In Cox, E.R. Phytoflagellates. [Ed.] Elsevier. North-Holland, New York, 351-379.
- INOUE, I. & CHIHARA, M. 1985. Morphology and ultrastructure of *Olisthodiscus luteus* (Raphidophyceae) with special references to the taxonomy. Bot. Mag. (Tokyo) 98: 251-262.
- IWASAKI, H. & SASADA, K. 1969. Studies on the red tide flagellates-II. On *Heterosigma inlandica* appeared in Gokasho Bay, Shima Peninsula. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 35:943-947.
- IWASAKI, H. 1971. Studies on the red tide flagellates-VI. On *Eutreptiella* sp. and *Exuviaella* sp. appeared in Bingo Nada, The Seto Inland Sea, in 1970. J. Oceanogr. Soc. Japan 27: 152-157 (en japonais).
- KLEIN, R.M. & CRONQUIST, A. 1967. A consideration of the evolutionary and taxonomic significance of some biochemical, micromorphological and physiological characters in the Thalophytes. Quart. Rev. Biol. 42: 105-296.
- KLEBS, G. 1982. Flagellatenstudien II. Z. Wiss. Zool. 55:353-445.
- KOHATA, K. & WATANABE, M. 1984. The use of a controlled experimental ecosystem (Microcosm) in studies of mechanism of red tide outbreaks, II-Growth of *Heterosigma akashiwo*, red tide flagellate, in Microcosm. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 63: 111-121 (en japonais).
- KOHATA, K. & WATANABE, M. 1986. Synchronous division and the pattern of diel vertical migration of *Heterosigma akashiwo*. (Hada) Hada (Raphidophyceae) in a laboratory culture tank. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 100: 209-224.
- KOHATA, K. & WATANABE, M. 1987a. The use of a controlled experimental ecosystem (Microcosm) in studies of mechanism of red tide outbreaks (V)-Growth and cell volume change of *heterosigma akashiwo*, a red tide flagellate. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 110:79-88 (en japonais).
- KOHATA, K. & WATANABE, M. 1987b. The use of a controlled experimental ecosystem (Microcosm) in studies of mechanism of red tide outbreaks (VI)-Diurnal change of C/N ratio and distribution of chloroplast pigments in the culture of *Chattonella antiqua*, a red tide flagellate. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 30:95-111 (en japonais).
- LEADBEATER, B. 1969. A fine structural study of *Olisthodiscus luteus* Carter. Brit. Phycol. J. 4:3-17.
- LOEBLICH, A.R. & FINE, K.E. 1977. Marine chloromonads: more widely distributed in neritic environments than previously thought. Proc. Biol. Soc. Wash. 90: 388-99.
- MIGNOT, J.P. 1976. Structure et ultrastructure de quelques Chloromonadines. Ultrastructure de *Chattonella subsalsa* Biecheler flagellé d'eau saumâtre. Protistologica 12:297-93.
- MIGNOT, J.P. 1976. Compléments a l' étude des Chloromonadines. Ultrastructure de *Chattonella subsalsa* Biecheler flagellé d'eau saumâtre. Protistologica 12:279-93.
- MORI, S., NAKAMURA, Y., WATANABE, M.M., YAMOCHI, S. & WATANABE, M. 1982. The effect of various environmental factors on the growth yield of red tide algae II. *Olisthodiscus luteus*. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 30:71-86 (en japonais).
- NAKAMURA, Y. 1987. Effects of growth conditions on nitrate, ammonium and phosphate uptake by *Chattonella antiqua*. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 110:115-126 (en japonais).
- NAKAMURA, Y., SAWAI, K., MOCHIDA, M. & WATANABE, M. 1987a. An approach to estimate the limiting nutrient of *Chattonella antiqua* in the Seto Inland Sea —Semicontinuous culture using natural seawater— Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 110:197-212 (en japonais).



- NAKAMURA, Y., SAWAI, K. & WATANABE, M. 1987b. Growth inhibition of a red tide flagellate, *Chattonella antiqua* by cupric ion. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 110:127-138 (en japonés).
- NAKAMURA, Y. & WATANABE, M.M. 1983. Growth characteristics of *Chattonella antiqua* grown in light/dark cycles. J. Oceanogr. Soc. Japan 39:151-155.
- NAKAMURA, Y. & WATABANE, M.M. 1984a. Effects of temperature, salinity, light intensity and pH on the growth of *Chattonella antiqua*. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 63:79-85 (en japonés).
- NAKAMURA, Y. & WATANABE, M.M. 1984b. Effects of nutrients on the growth of *Chattonella antiqua*. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 63:87-95 (en japonés).
- NAKAMURA, Y. & WATANABE, M.M. 1984c. Diurnal vertical migration of a red tide flagellate, *Chattonella antiqua* with special reference to the ecological role. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 63: 97-102 (en japonés).
- NAKAMURA, Y. & WATANABE, M.M. 1984d. Nitrate and phosphate uptake kinetics of *Chattonella antiqua*: Growth in light/dark cycle. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 63:103-109 (en japonés).
- NAKAMURA, Y., WATANABE, M.M. & WATANABE, M. 1982. The effect of various environmental factors on the growth yield of red tide algae. I. *Chattonella antiqua*. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 30:53-70 (en japonés).
- NICHOLS, P.D., VOLKMAN, J.K., HALLEGRAEFF, G.M. & BLACKBURN, S.I. 1987. Sterols and fatty acid of the red tide flagellates *Heterosigma akashiwo* and *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). Phytochemistry 26:2537-2541.
- NORO, T. & NOZAWA, K. 1980. Ultrastructure of a red tide chloromonadophycean alga *Chattonella* sp. from Kagoshima Bay, Japan. J. Phycol. 29:73-78.
- OKAICHI, T., NISHIO, S. & IMATOMI, Y. 1982. Collection and mass culture. In Toxic phytoplankton-Occurrence, mode of action, and toxins, Ed by Japan. Soc. Sci. Fish. Koseisha-Koseikaku, Tokyo, pp. 23-34 (en japonés).
- ONO, C. & TAKANO, H. 1980. *Chattonella antiqua* (Hada) comb. nov. and its occurrence on the Japanese Coast 102:93-99.
- SMITH, G.M. 1950. The Freshwater Algae of the United States. 2nd ed. McGraw-Hill, New York.
- STARR, R.C. & ZEIKUS, J.A. 1987. UTEX - The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. J. Phycol. 23 (Suppl):1-47.
- SILVA, P.C. 1980. Names of classes and families of living algae. Regnum Veg. 103:1-156.
- SUBRAHMANYAN, R. 1954. On the life-history and ecology of *Hornellia marina* gen. et sp. nov. (Chloromonadineae), causing green discoloration of the sea and mortality among marine organisms of the Malabar Coast. Indian Fish. 1:182-203.
- SUGAHARA, K., KOBAYASHI, Y., WATANABE, M.M. & WATANABE, M. 1982. Changes in cellular contents of ATP during growth of red tide algae. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 30:143-154 (en japonés).
- THOMASSON, K. 1963. Araucanian Lakes. Acta Phytogeogr. Suec. 47:1-139.
- TORIUMI, S. & TAKANO, H. 1975. *Fibrocapsa*, a new genus in Chloromonadophyceae from Atsumi Bay. Japan. Bull. Tokai Regional Fish. Res. Lab. 76:25-35.
- VESK, M. & MOESTRUP, O. 1987. The Flagellar Root System in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). Protoplasma 137:15-28.
- WATANABE, M. 1982. The diurnal variation in the cell densities of *Olisthodiscus luteus* and *Skeletonema costatum*. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 30:143-154 (en japonés).
- WATANABE, M. & HARASHIMA, A. 1982. The distribution pattern of *Olisthodiscus luteus* in convection cells. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 30:175-190 (en japonés).
- WATANABE, M., KOHATA, K. & HARASHIMA, A. 1982. Bioconvection in culture of *Olisthodiscus luteus* and Rayleigh-Taylor instability. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 30:155-173 (en japonés).
- WATANABE, M., KOHATA, K. & KUNUGI, M. 1987a. The vertical migration of *Heterosigma akashiwo* under salinity and phosphate stratifications and metabolism of intracellular phosphate pool. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 110:103-114 (en japonés).
- WATANABE, M., KOHATA, K. & KUNUGI, M. 1987b. Nuclear magnetic resonance study of intracellular phosphate pools and polyphosphate metabolism in *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada (Raphidophyceae). J. Phycol. 23:54-62.
- WATANABE, M. M., KOHATA, K., NAKAMURA, Y. & WATANABE, M. 1982. Phosphate-limited continuous culture of a red tide flagellate, *Olisthodiscus luteus*: Establishment of its method and the analysis of growth Kinetics. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 30:113-130 (en japonés).
- WATANABE, M.M. & NAKAMURA, Y. 1984a. Growth characteristics of a red tide flagellate, *Heterosigma akashiwo* Hada I. The effects of temperature, salinity, light intensity and pH on growth. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 63:59-68 (en japonés).
- WATANABE, M.M. & NAKAMURA, Y. 1984b. Growth characteristics of a red tide flagellate, *Heterosigma akashiwo* Hada I. The effects of temperature, salinity, light intensity and pH on growth. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 63:51-58 (en japonés).
- WATANABE, M.M., NAKAMURA, Y., MORI, S. & YAMOCCHI, S. 1982c. Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* Jap. J. Phycol. 30:279-288.
- WATANABE, M.M., NAKAMURA, Y. & KOHATA, K. 1983. Diurnal vertical migration and dark uptake of nitrate and phosphate of the red tide flagellates, *Heterosigma akashiwo* Hada and *Chattonella antiqua* (Hada) Ono (Raphidophyceae). Jap. J. Phicol. 31:161-166.
- WATANABE, M.M., NAKAMURA, Y. & KOHATA, K. 1984. Diurnal vertical migration of a red tide flagellate, *Heterosigma akashiwo* Hada, with special reference to the ecological role. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. 63:69-77 (en japonés).
- WATANABE, M., WATANABE, M.M., KOHATA, K. & HARASHIMA, A. 1982d. The use of a controlled

- experimental ecosystem (Microcosm) in studies of the mechanism of red tide outbreaks. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud., 30:11-26 (en japonés).
- WATANABE, M.M., YAMOCHI, S., KOHATA, K. & WATANABE, M. 1982e. Vertical migration and diel periodicity of phosphate uptake in a red tide flagellate, *Olisthodiscus luteus*. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud., 30: 131-141 (en japonés).
- YAMOCHI, S. 1983. Mechanisms for outbreak of *Heterosigma akashiwo* red tide in Osaka Bay, Japan. Part 1. Nutrient factors involved in controlling the growth of *Heterosigma akashiwo* Hada. J. Oceanogr. Soc. Japan 39:310-316.
- YOSHIDA, Y. & KAWAGUCHI, K. 1983. Buoyancy and phototaxis of *Chattonella antiqua* (Hada) Ono. Bull. Plankton Soc. Japan 30:11-19 (en japonés).